

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**

**BIOLOŠKI ODSJEK**

**UPALA I TUMOR**

**INFLAMMATION AND TUMOR**

**SEMINARSKI RAD**

Edi Rođak

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: Prof. dr. sc. Nada Oršolić

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. UPALA.....	3
2.1 Početak upalne reakcije .....	3
2.2 Citokini i kemokini – medijatori upale .....	4
3. MEĐUREAKCIJA UPALE I TUMORA.....	5
3.1 Uloga stanica imunološkog sustava u razvoju tumora.....	5
3.2 Uloga kemokina u razvoju tumora.....	6
3.3 Korištenje upale u suzbijanju tumora.....	8
3.4 Kronična upala i maligni tumori.....	9
3.5 Upala je loša?.....	10
4. SAŽETAK.....	11
5. ABSTRACT.....	12
6. LITERATURA.....	13

## **1. UVOD**

Upalni proces je važna komponenta nespecifičnog imunološkog odgovora. Iako je u većini slučajeva korisna i brani naše tijelo od potencijalno letalnih napada, upala može biti i loša. U zadnje vrijeme tema međureakcije tumora i upale se našla pod povećalom znanosti i rezultati otkrivaju drugu stranu upale.

## 2. UPALA

Jedna od glavnih sastavnica imunološkog odgovora je i upala. Dio je nespecifičnog imunološkog odgovora tijela, a simptomi su crvenilo, otekline, povišena temperatura, bol i gubitak funkcije (nepokretnost).

Po trajnosti ju možemo podijeliti na akutnu i kroničnu.

Akutna upala se javlja prilikom svakog imunološkog odgovora i traje dok se uzrok (antigen ili oštećenje) ne otkloni. Ponekad, imunološki sustav ne uspije otkloniti antigen te akutna upala prelazi u trajni oblik (kroničnu). U međureakciji s tumorom najčešće se javlja kronična upala.

Druga podjela upalnog procesa je na lokalnu upalu i sistemska upalu. Lokalna upala je ograničena na područje zahvaćeno oštećenjem (rana) ili područje pod utjecajem antigena. Sistemska upala obuhvaća cijeli organski sustav ili cijelo tijelo.

Ono što pokreće upalu, su stanice imunološkog sustava i njihovi produkti. Među glavnim posrednicima su granulirani leukociti (neutrofili, bazofili i eozinofili), mastociti, trombociti, te makrofagi<sup>[1]</sup>. Uz njih ne smijemo zaboraviti komponente komplementa koje svojim djelovanjem mogu regulirati tijek i trajanje samog procesa.

### 2.1 Početak upalne reakcije

Nakon podraživanja imunološkog sustava, bilo oštećenjem tkiva ili utjecajem antigena, prvi reaguju makrofagi koji nastanjuju napadnuto tkivo. Aktivacijom makrofaga dolazi do lučenja citokina i kemokina. Citokini su male molekule koje imaju uloge regulacije stanica imunološkog sustava na lokalnoj razini, dok kemokini imaju utjecaj na razini cijelog tijela i potiču kemotaksiju (kretanje uzrokovano kemijskim podražajem) stanica ili reguliraju rad organa imunološkog sustava<sup>[1]</sup>.

Lučenjem kemokina IL-8 od strane aktiviranih makrofaga dolazi do migracije neutrofila (granulirani leukociti) prema makrofagima. IL-8, osim što mobilizira neutrofile, potiče i njihovu degranulaciju.<sup>[2,28]</sup> Uz neutrofile, mobiliziraju se i monociti (diferenciraju u makrofage) pod utjecajem raznih kemokina (MCP-1, MIP-1a, MCP-4). Trombociti (u slučaju rane), bazofili i mastociti su glavni izvor histamina koji uzrokuje širenje krvnih žila, mobilizaciju eozinofila i kontrakcije glatkih mišića<sup>[1]</sup>. Širenjem žila omogućuje se prolazak stanica imunološkog sustava iz krvotoka u tkivo (ekstravazaciju). Posljedica širenja žila je i

istjecanje plazme u tkivo što uzrokuje oteklinu. Kontrakcijama glatkih mišića, histamin, povisuje krvni tlak te uzrokuje crvenilo.

Makrofagi, osim što iniciraju upalu, su glavni izvor citokina i kemokina tokom cijele upalne reakcije. Nakon što se oštećenje ili antigen uklone upalna reakcija staje i tkivo se popravlja, ponovno uz utjecaj „hormona“ imunološkog sustava – citokina i kemokina.

## **2.2 Citokini i kemokini – medijatori upale**

Citokini imaju zadaću regulacije imunoloških reakcija na razini tkiva u kojima se reakcija odvija, dok kemokini mobiliziraju stanice i šalju signale po cijelom organizmu<sup>[1]</sup>. Prema utjecaju na upalnu reakciju, citokine dijelimo na proupalne i anti-upalne. Proupalni citokini potiču stvaranje i održavanje upalne reakcije (primjer: TNF, IL-1), dok anti-upalni citokini suzbijaju reakciju (primjer: IL-4, IL-10, IL-13).

Interleukin 1 (IL-1) i faktor nekroze tumora (TNF – *engl. Tumour necrosis factor*) zajedno induciraju molekule koje potiču adheziju leukocita na stjenke krvnih žila što je korak prije njihove ekstrasvazacije u tkivo i početka upalne reakcije. Uz to, sintezu molekula koje pokreću kaskadnu reakciju koja rezultira upalom. Neke od tih molekula su iNOS (inducibilna NO sintetaza), IL-8 kemokin (kemotaksija i aktivacija neutrofila) i PAF (faktor aktivacije trombocita).<sup>[3]</sup>

S druge strane, anti-upalni citokini sprečavaju (ili suprimiraju) pokretanje kaskade. Primjerice, IL-4, IL-10, IL-13 i TGF- $\beta$  (transformirajući faktor rasta – *engl. Transforming growth factor*) suprimiraju sintezu TNF, IL-1, IL-8 i molekula koje adheriraju leukocite na endotel krvnih žila.<sup>[3]</sup>

Iz navedenih primjera zaključuje se da citokini i kemokini određuju tijek, snagu i trajanje upalne reakcije i da njihova ravnoteža regulira rad imunološkog sustava.

### 3. MEĐUREAKCIJA UPALE I TUMORA

Razna kemijska ili virusna nepovratna somatska oštećenja stanica stvaraju stanice koje su na granici razvoja tumora. Prema radu Peytona Rousa takve stanice su „klice“ iz kojih se razvijaju tumori<sup>[4]</sup>. Takvo stanje stanice se naziva inicijacija i takva stanica može mirovati u tijelu, ako se ne pojavi podražaj koji će pokrenuti rast tumora. Kemijski iritanti, hormoni, kronična iritacija tkiva i upala su neki od pokretačkih podražaja. Ti podražaji pojačavaju proliferaciju stanica, stvaranje dodatnih oštećenja DNA, mobilizaciju upalnih stanica i produljenje akutne upale u kroničnu.

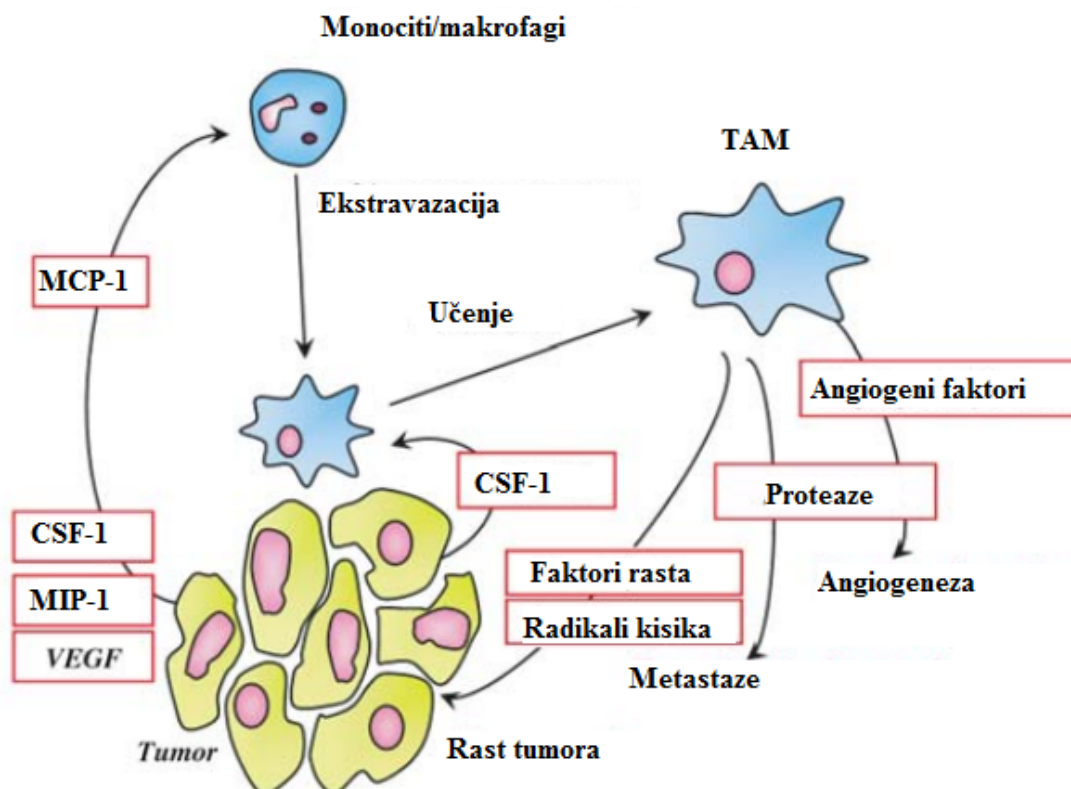
#### 3.1 Uloga stanica imunološkog sustava u razvoju tumora

Tumori imaju sposobnost stvaranja i lučenja citokina i kemokina koji privlače okolne leukocite i stvaraju upalni mikrookoliš oko tumora. Privučeni leukociti regrutiraju mastocite, dendritičke stanice, pa čak i limfocite. Sve privučene stanice imaju sposobnost proizvodnje citokina i kemokina koje stvaraju željeni mikrookoliš oko tumora.

Uloga dendritičkih stanica u normalnoj imunološkoj reakciji je prepoznavanje antigena i predočavanje tog antigena limfocitima T.<sup>[1]</sup> Nastaju iz monocita pod utjecajem faktora rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF–*engl. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) te nakon doticaja s antigenom, putuju u limfne čvorove gdje ga predočavaju limfocitima T. Zanimljivo je da dendritičke stanice koje okružuju tumor nemaju sposobnost stimuliranja limfocita T ili su nezrele, a i faktori koje stanice tumora izlučuju ( IL-6, CSF-1) sprečavaju nastanak dendritičkih stanica i potiču diferencijaciju monocita u makrofage.<sup>[5]</sup>

Tokom razvoja tumora se pojavljuje nova linija makrofaga: tumoru pridruženi makrofagi (TAM–*engl. Tumour-associated macrophages*). Takvi makrofagi pomažu rast tumora i štite ga.

Lučenjem raznih kemokina i citokina te faktora rasta oni osiguravaju optimalne uvjete za razvoj tumora. VEGF-A (faktor rasta krvnih žila A–*engl. Vascular endothel growth factor A*) je jedan od proizvoda TAM makrofaga te potiče angiogenezu. Proliferaciju stanica potiče TGF- $\alpha$ , imunosupresiju omogućuje IL-10, a nove makrofage i neutrofile privlači CXCL1 kemokin uz MCP-1 i mnoge druge.<sup>[6]</sup>



Slika 1. Nastanak tumoru pridruženih makrofaga – TAM

(preuzeto od: Mayumi Ono<sup>[6]</sup>)

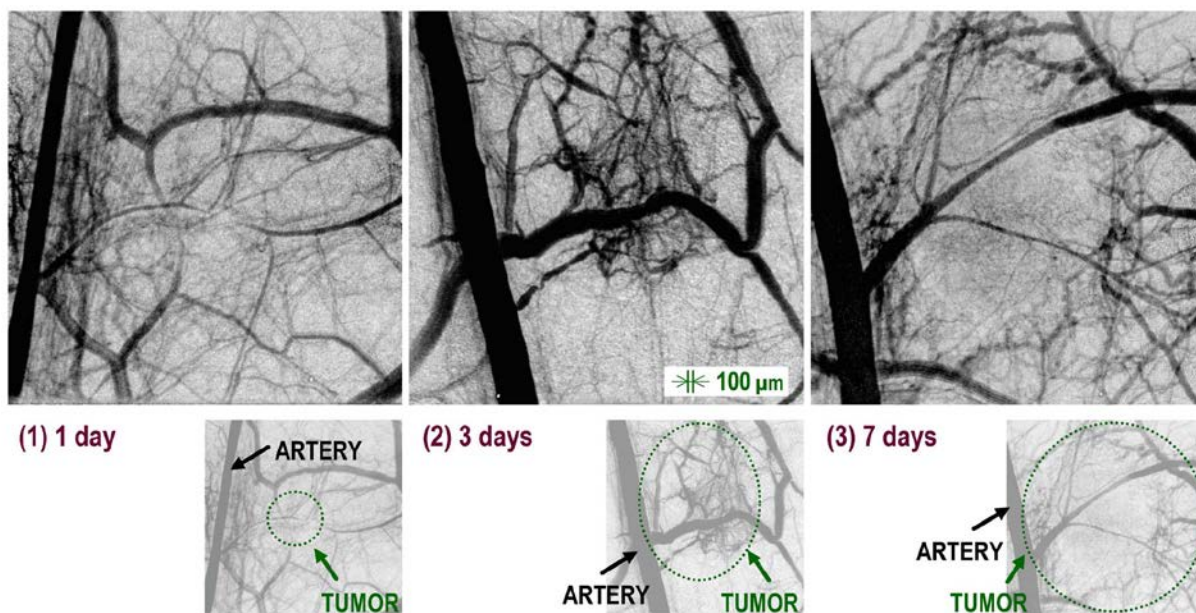
### 3.2 Uloga kemokina u razvoju tumora

Uloga kemokina je prvotno definirana kao regulatora mobilizacije leukocita, no sada se zna da kemokini imaju utjecaj na sve stanice, pa tako i stanice tumora.<sup>[8]</sup> Tumori imaju sposobnost mijenjanja kemokinskih receptora i promjene odgovora na podražaj određenim kemokinom.

Osim što lučenjem kemokina regrutiraju upalne stanice, tumori ih koriste za regulaciju svog rasta i proliferacije. Primjerice, kemokini CXCL1, CXCL2, CXCL3 i CXCL8 u stanicama melanoma potiču proliferaciju stanica.<sup>[9]</sup> Blokiranje receptora za navedene kemokine ili supresija ekspresije smanjuje proliferaciju stanica melanoma *in vitro*.<sup>[10]</sup> Drugi primjer iskorištavanja kemokina od strane tumora je prekomjerno ispoljavanje proupalnog makrofagnog kemokina 3α (MIP-3α–*engl. Macrophage pro-inflammatory chemokine-3α*) u stanicama raka slezene što potiče migraciju tumoru pridruženih makrofaga (TAM).<sup>[11]</sup>

Povećavanjem volumena tumora potrebno je uvoditi i infrastrukturu koja će dopremiti kisik i hranjive tvari do tumorske mase. Da bi riješili taj problem, tumori potiču angiogenezu uz pomoć kemokina.

Odluka da li će proces angiogeneze krenuti ili ne ovisi o ravnoteži između pro-angiogeničkih i anti-angiogeničkih faktora.<sup>[12]</sup> Sam proces angiogeneze je odvojen od upale i strogo kontroliran, ali se javlja u prisustvu bolesti koje su posljedica kronične upale kao psorijaze, reumatodnog artritisa i fibroze. Također, angiogeneza je nužna za metastaze tumora<sup>[12]</sup>. CXC kemokini, točnije kemokini koji imaju ELR motiv (Glu-Leu-Arg) imaju sličan, ali slabiji, utjecaj kao VEGF-A (faktor rasta krvnih žila–*engl. Vascular endothel growth factor*) i pokreću diferencijaciju stanica u stanice krvnog endotela. S druge strane, CXC kemokini bez ELR motiva (CXCL9, CXCL10) su antagonisti i zaustavljaju istu.<sup>[13,14]</sup>



Slika 2. Praćenje angiogeneze u tumoru angiogramom kroz 7 dana

(<http://www.spring8.or.jp/en/>)

Zadnji stupanj razvoja tumora su metastaze. To je proces u kojem stanice tumora napuštaju mjesto rasta i šire se po ostatku organizma kroz krvožilni sustav. Još uvijek se ne zna kako se stanice šire. Da li preferiraju određeni tip tkiva? Da li ih neki organi „privlače“ više nego ostali?

Postoji teorija da kemokini „navode“ metastazirane stanice prema određenim tkivima.<sup>[12]</sup> U istraživanju na raku dojke otkriven je uzorak metastaziranja raka za koji se smatra da je pod



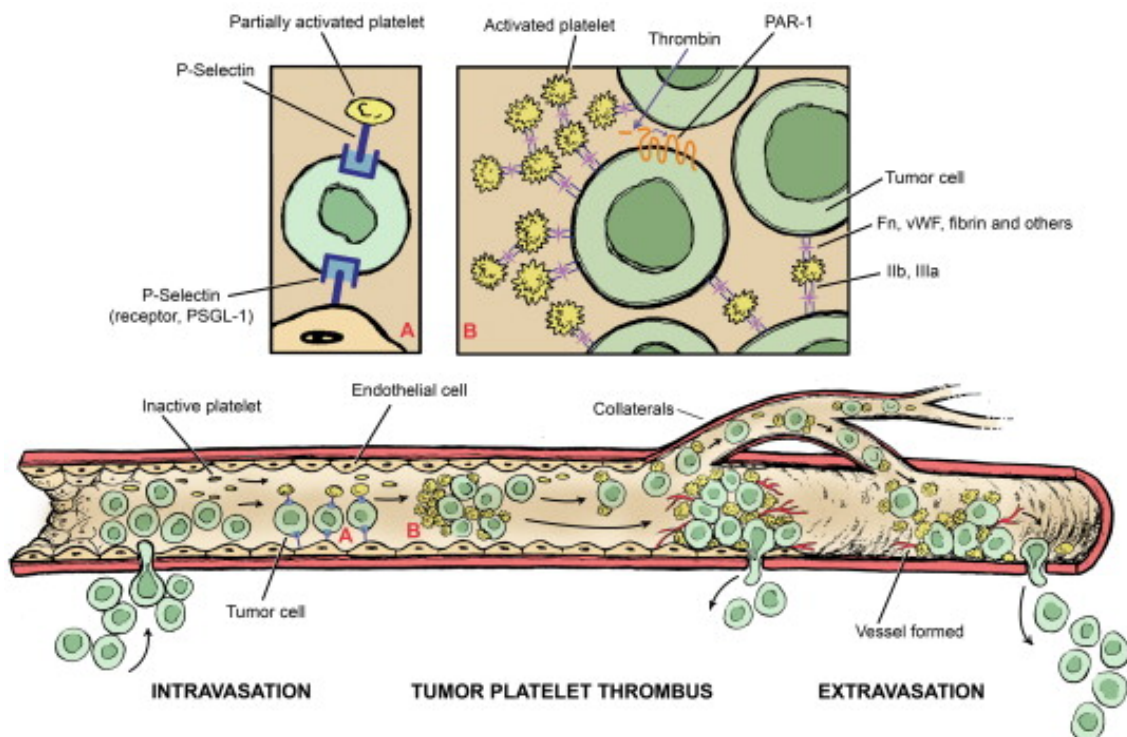
kontrolom CXCL12 i njegovog receptora (CXCR4). CXCL12 je poprilično rijedak, ali zabilježena je povećana količina u organima (koštana srž, jetra, pluća, limfni čvorovi) koji su meta metastaza raka dojke.<sup>[15]</sup> Utjecaj CXCL12 je potvrđen *in vitro* testovima gdje se vidjelo da dodavanje CXCL12 u ekstrakte navedenih organa izaziva pozitivnu kemotaksiju stanica raka dojke, a dodavanjem antitijela specifičnih za receptor CXCR4 ne dolazi do kemotaksije.<sup>[16]</sup>

### 3.3 Korištenje upale u suzbijanju tumora

Da li suzbijanje upale smanjuje rizik od nastanka tumora? Ispitivanjem pacijenata koji su dugo koristili aspirin i antiupalne lijekove bez steroida (NSAIDs—*engl. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) pokazuje smanjenje rizika od raka debelog crijeva za 40-50% i možda smanjuje rak pluća i rak želuca.<sup>[17,18]</sup> Aspirin i NSAID lijekovi inhibiraju COX-1 i COX-2 (ciklooksigenaza 1 i 2), sprečavaju nastanak upale u oštećenim tkivima, te stanice koje imaju oštećenja (stanje inicijacije) ne prelaze u stanje rasta.<sup>[19]</sup>

NSAID lijekovi možda utječu i na sposobnost stvaranja metastaza. Flubiprofen sprečava agregaciju trombocita koje metastaze nekada koriste kao štit od imunološkog sustava dok putuju kroz krvne žile.<sup>[20]</sup> (Slika 3)

TNF- $\alpha$  je proupalni citokin koji je važan u ranim stadijima razvoja tumora jer regulira kaskadne reakcije citokina, kemokina, adheziju stanica, pa čak i angiogenezu.<sup>[21]</sup> Iako njegovo ime sugerira da je TNF- $\alpha$  supresor tumora, ovim utjecajem TNF- $\alpha$  možda čak i pomaže razvoju tumora. Regulacijom ili supresijom tog citokina možda je moguće smanjiti rizike od nastanka tumora..



Slika 3. Stvaranje agregata tumora i metastaza i adhezija na endotel uz P selektin

(Nierodzik ML, Karpatkin S. <sup>[29]</sup>)

### 3.4 Kronična upala i maligni tumori

Iz navedenog se vidi da upalne stanice i stanice tumora su gotovo uvijek zajedno. Da li upala prethodi nastanku tumora? Da li infekcija koja pokrene proces upale neposredno stvara tumor?

Sada već postoji puno dokaza da su neki tumori posljedica infekcije i kronične upale<sup>[22-25]</sup>. Smatra se da je oko 1.2 milijuna slučajeva raka godišnje posljedica infekcije.<sup>[22]</sup>

Konstantna infekcija stvara kroničnu upalu. Leukociti i ostale upalne stanice stvaraju štetu u okolnom tkivu lučenjem reaktivnih radikala što izaziva prelazak iniciranih stanica<sup>[4]</sup> u stanje malignosti.

Možda najbolji primjer je kronična infekcija bakterijom *Helicobacter pylori* koja se smatra najvećim uzročnikom raka želuca.<sup>[26,27]</sup> Rak želuca je drugi najčešći rak u svijetu<sup>[22,25]</sup>, a *H.pylori* ga uzrokuje izazivanjem kronične upale koja oštećuje okolno tkivo.<sup>[26,27]</sup> DNA virusi također mogu izazivati oštećenja genoma stanica ubacivanjem aktivnih onkogen

stanični genom. Takvi slučajevi nisu česti, ali hepatitis B i Epstein-Barr virus mogu izazvati maligne promjene.

### **3.5 Upala je loša?**

Na kraju ovog teksta ostaje dojam da upalna reakcija stvara više štete nego koristi. Na početku razvoja tumora, upalne stanice su jak promotor rasta, stvaraju pozitivan mikrokoliš za razvoj, stvaraju oštećenja DNA, te potiču angiogenezu. Citokini i kemokini igraju važnu ulogu u regulaciji rasta i ponašanja tumora, a produkt su upalnih stanica. Iako tumor može regrutirati upalne stanice i podvrgnuti ih svojoj kontroli, te iste stanice zaustavljaju rast tumora i uništavaju ga.

Naravno, jasno je da antiupalna terapija pomaže i suprimira rast tumora, no kakav utjecaj to ima na ostatak tijela? Smanjenje imunološke potentnosti u ostatku tijela može izazvati hrpu novih problema.

Razumijevanjem međureakcije između upale i tumora i razvojem znanosti mogli bi okrenuti citokine i kemokine u svoju korist i poticati proizvodnju anti-tumorski komponenti.

## 4. SAŽETAK

Peyton Rous je došao do zaključka da mala stalna oštećenja stanica stvaraju inicijacijske točke za daljnji razvoj tumora.<sup>[4]</sup> Takve točke trebaju drugi poticaj koji će ih pokrenuti. Često je to i upala. Upalni proces stvara slobodne radikale koji oštećuju okolno tkivo. Nastala klica tumora kreće s rastom te luči citokine i kemokine koji su „hormoni“ imunološkog sustava. Tim potezom tumor dobiva sposobnost mobiliziranja i regrutiranja imunoloških stanica koje koristi za regulaciju svog rasta, prilagođavanje mikrookoliša svojim potrebama, a na kraju i za metastaziranje u nove organe.

Osim oštećenja uzrokovanih akutnom upalom, ustrajale infekcije koje uzrokuju kroničnu upalu za posljedicu mogu imati nastanak tumora. *Helicobacter pylori* je potvrđeno glavni uzročnik raka želuca – drugog po učestalosti u svijetu.

Suzbijanje upale smanjuje rizik od nastanka tumora, ali to nije odgovor. Upala je dvosjekli mač. Iako pod kontrolom tumora pomaže njegov razvoj, upala je jedan od načina kako imunološki sustav otklanja tumora. Kod osobe koja već ima oslabljeni imunološki sustav, suprimiranje upalnog odgovora bi otvorilo frontove za nove infekcije.

Daljnjim istraživanjem možda nađemo način kako iskoristiti upalnu reakciju protiv tumora i okrenemo ravnotežu citokina i kemokina lokalno, ali globalna supresija upale nije odgovor.

## 5. ABSTRACT

Peyton Rous came to conclusion that small, permanent damages to cells produce initiation points for tumor growth. <sup>[4]</sup> Those initiation points still need a second stimulus which will promote them into growth. Frequently, that stimulus is inflammation. Inflammation process produces reactive radicals which damage nearby tissue. Promoted cells start growing and producing cytokines and chemokines which are “hormones” of immune system. With control of them, tumor starts recruiting other immune cells which it uses for regulation of its own growth, micro environment, and metastasis.

Not only damage caused by acute inflammation can be the cause of tumor growth, persistent infections which cause chronic inflammation can cause it too. *Helicobacter pylori* is confirmed the main cause of stomach cancer – second most frequent in the world.

Suppression of inflammation lowers the risk of cancer growth, but that isn't the solution. Inflammation is double edged sword. Under tumor control inflammation helps its growth; it's still one of the ways immune system deals with tumors. Suppressing inflammation in person that has weak immune system would only open up new frontiers for other infections.

Continued research might find a way to use inflammation reaction against tumors and turn the cytokine and chemokine balance locally because suppressing inflammation globally isn't the answer.

## 6. LITERATURA

1. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D. *Imunologija*. Sedmo izdanje, Medicinska Naklada, Zagreb, Hrv. 2010.
2. Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M. Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking and effector function; *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2003, 111(6):1185-99
3. Dinarello C. Proinflammatory Cytokines; *CHEST* 2000, 118:503-508
4. Rous P, Kidd J. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic states: a study of the tar tumors of rabbits; *J. Exp. Med.* 1941, 73:365-389
5. Ma Y, Aymeric L, Locher C, Kroemer G, Zitvogel L. The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer; *Curr. Opin. Immunol.* 2011, 23(1):46-52
6. Mayumi O. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy; *Cancer Science* 2008, 99(8):1501-1506
7. Schoppmann S, et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis; *Am. J. Pathol.* 2002, 161:947-956
8. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors; *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18:217-242
9. Richmond A, Thomas H. Purification of melanoma growth stimulatory activity; *J. Cell Physiol.* 1986, 129:375-384
10. Norgauer J, Metzner B, Schraufstetter I. Expression and growth-promoting function of the IL-8 receptor  $\beta$  in human melanoma cells; *J. Immunol.* 1996, 156:1132-1137
11. Kleeff J, et al. Detection and localization of Mip-3 $\alpha$ /LARC/Exodus, a macrophage proinflammatory chemokine, and its CCR6 receptor in human pancreatic cancer; *Cell* 2000, 100:465-472
12. Hannah D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer; *Cell* 2000, 100:57-70
13. Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer; *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002, 13:143-154
14. Strieter RM, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis; *J. Biol. Chem.* 1995, 270:27348-27357
15. Muller A, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis; *Nature* 2001, 410:50-56

16. Moore MA. The role of chemoattraction in cancer metastases; *BioEssays* 2001, 23:674-676
17. Baron JA, Sandler RS. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention; *Annu. Rev. Med.* 2000, 51:511-523
18. Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs; *Emidemiology* 2001, 12:88-93
19. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development; *Oncogene* 1999, 18:7908-7916
20. Mamybekova A, Rezabek K, Kacerovska H, Grimova J, Svobodova J. Antimetastatic effects of flubiprofen and other platelet aggregation inhibitiros; *Neoplasma* 1986, 33:417-421
21. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor?; *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002, 13:135-141
22. Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as major preventable cause of human cancer; *J. Intern. Med.* 2000, 248:171-183
23. Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk; *Cancer Res.* 1995, 55:562-565
24. Scholl SM, et al. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis; *J. Natl. Cancer. Inst.* 1994, 86:120-126
25. Schacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer; *Oncology* 2002, 16:271-226
26. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer; *Annu. Rev. Microbiol.* 2000, 54:615-640
27. Lee YY, Raj SM, Graham D. *Helicobacter pylori* Infection – A Boon or a Bane: Lessons from Studies in a Low-Prevalence Population; *Helicobacter* 2013, 18(5):338-346
28. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation; *Periodontology* 2000, 2013; 63(1):149-164

- 29.** Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype; *Cancer Cell* 2006, 10(5):355-362